

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許公開番号

特開平7-188284

(43) 公開日 平成7年(1995)7月25日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 7/06		8318-4H		
A 2 3 K 1/16	3 0 3 F	9123-2B		
A 2 3 L 1/305				
A 6 1 K 38/00	ADN			

A 6 1 K 37/ 02 ADN

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-337885

(22) 出願日 平成5年(1993)12月28日

(71) 出願人 000118497

伊藤ハム株式会社

兵庫県神戸市灘区備後町3丁目2番1号

(71) 出願人 592219307

阪急共栄物産株式会社

大阪府大阪市北区角田町8番7号 阪急ビル内

(72) 発明者 香川 恭一

大阪府池田市古江町180番地 阪急共栄物

産株式会社薬理研究所内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血中トリグリセリド濃度上昇抑制ペプチド及び当該ペプチドを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 血中トリグリセリド濃度上昇抑制ペプチド並びに当該ペプチド等を有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤、血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した特定保健用食品（いわゆる機能性食品）及び血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した飼料の提供。

【構成】 アミノ酸配列がLeu Val Val Tyr Pro Trp Thrのペプチド並びに当該配列表記載のペプチド、Val-Tyr-Pro 及び/又はVal-Thr-Leu を有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤、これらのペプチドを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した特定保健用食品及びこれらのペプチドを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した飼料。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 アミノ酸配列が配列番号1であるペプチド。

【請求項2】 アミノ酸配列が配列番号1であるペプチド及び/又はVal-Tyr-Pro及び/又はVal-Thr-Leuを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤。

【請求項3】 アミノ酸配列が配列番号1であるペプチドあるいはアミノ酸配列が配列番号1であるペプチド並びにVal-Tyr-Pro及び/又はVal-Thr-Leuを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した

特定保健用食品。  
【請求項4】 アミノ酸配列が配列番号1であるペプチドあるいはアミノ酸配列が配列番号1であるペプチド並びにVal-Tyr-Pro及び/又はVal-Thr-Leuを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した飼料。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規の血中トリグリセリド濃度上昇抑制ペプチド並びに当該ペプチド等を有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤、血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した特定保健用食品（いわゆる機能性食品）及び血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した飼料に関する。

【0002】なお、本発明トリグリセリド濃度上昇抑制剤の投与による脂血清浄作用により人若しくは動物の肥満や高脂血症及びそれに伴う高血圧症や動脈硬化症等の循環器系疾患の予防や治療が可能になる。さらには、家畜や養殖魚における肉質の改善が可能になる。

## 【0003】

【従来の技術】脂肪や糖質を過剰に摂取すると肥満や高脂血症の原因となることが知られている。そして高脂血症における血中トリグリセリド（以下、TGと記載することがある）濃度の上昇は、高血圧症や動脈硬化症を引き起こす原因となるといわれている。そこで現在、TGの血中濃度の上昇を抑制して肥満や高脂血症を改善するために多くの試みが行われている。

【0004】現在、TGの血中濃度の上昇を抑制するために、食事制限やダイエット食（例えば、ファイバー）の摂取、さらには各種の医薬品の投与が行われている。当該医薬品としては、例えば血中リポ蛋白リパーゼ活性を高めるデキストラン硫酸、脂質吸収を抑制するニコモール、脂質代謝改善剤であるクロフィブラートやグラバスタチン等が現在用いられている。

【0005】しかし、食事制限はそれをする者にとって苦痛であり、また上記医薬品の投与による副作用の起るも懸念されている。よって、より強力な血中TG濃度の上昇抑制効果を有し、かつ副作用が起こることが懸念されない血中TG濃度上昇抑制剤の開発が待たれている。

一方、家畜や養殖魚に対しては、現在、成長の促進を企

図して濃厚飼料が与えられている。その結果としてこれらの家畜や養殖魚中においても脂肪代謝異常がおこり血中TGの濃度が上昇する傾向にある。血中TG濃度の上昇によって、家畜や養殖魚中の脂肪含有率が過剰になり、脂肪摂取過多の原因となる。その上、味覚の点でも消費者の嗜好に合わなくなってきている。また、これらの脂肪含有率の増加は飼料の浪費問題、ひいては屠体に付着した脂肪の廃棄問題等にも関連する重要な問題である。よって血中のTGの上昇を抑制することは、特に我が国の畜産界や水産界における急務である。

【0006】最近では、本発明者の一人が知って開発したオリゴペプチド含有物についての出願がされ（国際公開番号 W089/06970 公報）、さらに当該類似技術について特開平2-154693号公報に記載されている。また、ある種のオリゴペプチドが血中TGの上昇抑制効果を含む脂質代謝改善効果を有することが明らかにされている（香川恭一：月刊フードケミカル、6、80（1990）、福浜千津子等：日本薬理学雑誌、97、p38（1991））。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記の出願公報等において開示されたオリゴペプチド含有物は、その組成が蛋白の分解物の混合物であり、真の有効成分、すなわち有効成分としてのペプチドのアミノ酸配列は明らかにされていない。このことは、当該ペプチド含有物は医薬品として応用するには純度が低い。さらに、食品に配合した場合に食品中のペプチドと区別して定量することが困難になり、品質管理上の問題がある。

【0008】そこで、当該ペプチド含有物の真の有効成分、すなわち有効成分としての血中TG濃度上昇抑制ペプチドを探索するのが課題となる。すなわち本発明は、上記有効成分としてのペプチドのアミノ酸配列の解析並びに当該ペプチド等を有効成分として含む血中TG濃度上昇抑制剤、血中TG濃度上昇抑制機能を付与した機能性食品及び血中TG濃度上昇抑制機能を付与した飼料の提供を課題とする。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者は上記課題の解決のために鋭意検討した結果、以下の発明により上記課題が解決され得ることを見出した。すなわち、本発明は以下の事項をその要旨とするものである。

(1) アミノ酸配列が配列番号1であるペプチド。

【0010】(2) アミノ酸配列が配列番号1であるペプチド及び/又はVal-Tyr-Pro及び/又はVal-Thr-Leuを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤。

(3) アミノ酸配列が配列番号1であるペプチドあるいはアミノ酸配列が配列番号1であるペプチド並びにVal-Tyr-Pro及び/又はVal-Thr-Leuを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した特定保健用食品。

【0011】(4) アミノ酸配列が配列番号1であるペプチドあるいはアミノ酸配列が配列番号1であるペプチド並びにVal-Tyr-Pro及び又はVal-Thr-Leuを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した飼料。

以下、本発明について詳細に説明する。本発明ペプチドである、アミノ酸配列が配列番号1であるペプチド及び本発明血中T G濃度上昇抑制剤中に有効成分として含有されることのあるVal-Tyr-ProとVal-Thr-Leu(以下、本発明ペプチドと記載する)は、自然界に存在する蛋白質から分離精製することが可能である。また、これを直接通常公知の方法により化学合成することが可能である。さらに上記ペプチド配列に対応した塩基配列を有する遺伝子を調製してこれを適切な発現ベクターに組み込んで、当該遺伝子を適切な宿主中で発現させることにより本発明ペプチドを調製することもできる。

A. 以下に、自然界に存在する蛋白質から上記ペプチドを分離精製する手段について説明する。

【0012】本発明ペプチド等の原材料としては、魚肉蛋白、魚粉、グロビン等の動物性蛋白質；小麦グルテン、大豆カゼイン等の植物性蛋白質等を広く用いることができる。これらの蛋白質の中でも、ヘモグロビンやミオグロビン等のグロビン蛋白は、血中T G濃度の上昇を抑制するという所期の効果を強く奏し得るといふ点において特に好ましい。

【0013】なお、かかるグロビン蛋白の提供源である動物の種類は特に限定されず、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヒト、ウマ等の血液を広く用いることができる。次に上記の蛋白質を加水分解することが必要である。当該加水分解に関する操作等は、前出の国際公開番号 W089/06970 公報記載の方法に従う。また用いる加水分解酵素としては、例えば酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ又はアルカリ性プロテアーゼの1種若しくは2種以上を用いることができる。

【0014】ここに、グロビンの蛋白質を加水分解する際の条件等について述べる。まず、グロビン蛋白含有物を固形分として水に5~30重量%になるように分散させ、酸若しくはアルカリによってプロテアーゼの至適pHに調整し、プロテアーゼを一度に若しくは逐次的に添加して、20~70℃の温度で3~48時間、当該酵素を反応させて加水分解反応を行うことができる。

【0015】次に、得られた蛋白質分解物を乾燥して又は当該蛋白質分解物をカルボキシメチルセルロースあるいはデキストリン等の増量剤を適量加えて、乾燥・固化する。ことにより、血中T G濃度上昇抑制効果を有する蛋白質分解物を得ることができる(以下、分解物と記載する)。かかる分解物は、上記本発明ペプチド等を最低でも0.1重量%含有する。

【0016】次にここで酵素処理を行った本発明蛋白質分解物の精製を行う。かかる精製工程は通常公知の精製工

程を採用することができる。すなわち、イオン交換樹脂法、限外濾過法、逆相クロマトグラフィー法等を適宜組み合わせ、所望のペプチドを包含するフラクションを精製することができる。

【0017】なお上記分離手段において、イオン交換樹脂法や限外濾過法による操作は必ずしも必須のものではないが、分離・精製度を向上させるという観点から分離・精製工程に組み入れるのが好ましい。酸性下における逆相クロマトグラフィーと中性下における逆相クロマトグラフィーにおける操作を組み合わせたことによって分離・精製が可能である。また、フラクション中の蛋白量は通常公知の蛋白定量法、例えばニンヒドリン法等によって測定することが可能である。

【0018】そして、このようにして選別したフラクションのアミノ酸配列は、通常公知の方法により同定することによって、本発明ペプチド等の存在を確認することができる。このように分離したフラクションに由来する本発明ペプチド等を本発明血中T G濃度上昇抑制剤の有効成分として用いることができる。

【0019】また、さらにこのようにして分離されたフラクションを、直接本発明血中T G濃度上昇抑制剤の有効成分として用いることもできる。さらに本発明ペプチド等は、通常公知のペプチド合成法によって化学合成することができる。例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、カルボイミダゾール法、酸化還元法、DCC-アディティブ(HOBT, HOBT, HOSu)法(「ザ ペプチド(The Peptide)」第1巻(1966年), Schreder & Lukke 著, Academic Press, New York, USA; あるいは「ペプチド合成」泉谷ら著, 丸善株式会社(1975年)等)等のペプチド合成法を例示することができる。

【0020】なお上記のペプチド合成法においては、固相合成法又は液相合成法のいずれでも行うことができる。また上記ペプチド合成法においては、側鎖官能基を有するアミノ酸、例えばチロシンやスレオニンは、当該側鎖官能基を保護しておくのが好ましい。これに用いられる保護基としては、通常公知の保護基、例えばベンジルオキシカルボニル基(Boc-), t-ブトキシカルボニル基(Boc-), パンジル基(Bz-)等を用いることができる。

【0021】なお、当該保護基は通常公知の方法で、本発明ペプチド等の合成工程において脱保護を行うことができる。

B. 本発明ペプチド等を有効成分として、血中T G濃度上昇抑制剤を調製することができる。当該血中T G濃度上昇抑制剤の剤形としては、使用形態に応じた製剤を調製するのに通常慣用される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤等の賦形剤ないしは希釈剤をいずれも使用できる。製剤組成形態は、これが本発明ペプチド等を効果的に含有する形態であれば特に限定はなく、例えば錠剤、粉末剤、顆粒剤、丸剤等の固剤であっ

てもよい。また、液剤、懸濁剤、乳剤等の注射剤形態とすることもできる。また、これは使用前に適当な相体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることもできる。これらはいずれも常法に従い調製できる。

【0022】かくして得られる血中T G濃度上昇抑制剤の投与量は、当該製剤の投与方法、投与形態、投与する患者の症状等に応じて適宜選択される。一般には、本発明ペプチド等を約0.001~80重量%程度を含有する製剤形態に調製して、当該製剤に含有される本発明ペプチド等の量が一日成人一人当たり、約1mg~100mg程度となる範囲で投与するのが好ましい。なお、当該投与は必ずしも一日一回である必要はなく一日3~4回に分けて投与することも可能である。

【0023】上記各種形態の医薬製剤は、その形態に応じた適切な投与経路、例えば注射剤形態においては、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内投与等により、固剤形態の医薬製剤は、経口投与等により投与され得る。C. 本発明ペプチド等を有効成分として、特定保健用食品（いわゆる機能性食品）を調製することができる。また、当該ペプチドを一般食品の食品添加物として用いることもできる。

【0024】上記食品の種類としては特に限定されず、ミルク、プリン、カレー、ハヤシ、シチュー、ミートソース、ハム、ケーキ、チョコレート等に適用することが可能である。特にミルクは、小児が直接摂取することが味覚の点で困難である本発明ペプチド等の摂取を容易にし得るという点において好ましい。また、本発明ペプチド等をケーキ、チョコレート等の本来の肥満を助長する食品に添加することは、当該食品の摂取による肥満を予防し得るという点において好ましい。

【0025】本発明ペプチド等の上記食品中における配合量は、食品の種類、添加する目的、当該食品の摂取によって期待する効果等に応じて適宜選択される。一般には、本発明ペプチド等換算で一食当たり0.1mg~4mg程度の摂取が可能な程度に、本発明ペプチド等を上記食品中に含有させるのが好ましい。

D. 本発明ペプチド等を飼料に配合することによって、家畜等の血中T G濃度の上昇抑制機能が付与された飼料を調製することができる。

【0026】本発明ペプチド等が配合される飼料は、牛、豚、鶏等の家畜用飼料であると、タイ、ハマチ等の養殖魚用飼料であることを問わない。本発明ペプチド等の

飼料中への配合量は、飼料の種類、当該飼料の採取によって期待する効果等に応じて適宜選択される。一般には、飼料中に本発明ペプチド等換算で0.1~4重量%の割合で配合するのが好ましい。

【0027】

【実施例】以下に実施例等を記載して本発明をさらに具体的に説明する。ただし本発明の技術的範囲が本実施例等によって限定されるものではない。

【参考例】グロビン蛋白分解物の製造

10 以下にウシ赤血球を用いた製法の詳細を示す。なお、分子重量分布はゲル濾過クロマトグラフィーを用いて調べた（図1）。

【0028】なお、当該クロマトグラフィーは以下の条件で実施した。

装置 : 高速液体クロマトグラフ（株）島津製作所、LC-6A型）

カラム : PolyHYDROXYETHYL A, 5  $\mu$ m, 9.4 $\times$ 200mm, P olyC Inc製

溶出溶媒 : 50mM 酢酸

20 流速 : 0.5ml / 分

検出 : 紫外吸収 (221nm)

新鮮なウシ赤血球100kgに水250lを加えて充分溶血させ、リン酸を加えてpHを2.8に調整した後、アスペルギルス・ニガリの酸性プロテアーゼ2.6 $\times$ 10<sup>7</sup>単位を添加し、50℃、3時間反応させた。

【0029】反応後、反応液を80℃で30分間加熱して反応を停止させた後、水酸化カルシウムの水懸濁液を加えてpHを6.5に調整し、硫酸土10kgを加え、フィルタープレスを用いて濾過し、得られた濾液を真空乾燥して23kgの粉末を得た。

30 【実施例1】血中T G濃度上昇抑制ペプチドの分画精製法

本発明ペプチド等は下記の実施例に示す。1. イオン交換、2. 限外濾過、3. 酸性下における逆相カラムクロマトグラフィーによる分離、4. 中性下における逆相クロマトグラフィーによる分離という手順をおって得た。

【0030】これらの操作を用いた際の回収率は表1に示した。なお、蛋白質量はニンヒドリン法によって測定した。

40 【0031】

【表1】

表1 脂肪細胞分化抑制剤ペプチドのグロビン蛋白分解物からの回収率

部 分	蛋白質量(g)	収率(%)	定 量 法
グロビン蛋白分解物	13.7	100	酸加水分解後 <sup>10</sup> の分析法
① 交換イオン層析	4.24	30.9	同上
② 逆相(酸性)クロマトグラフィー			
① 画分A	0.039	0.28	酸加水分解後 <sup>10</sup> の分析法
② 画分A'	0.0095	0.064	同上
③ 逆相(中性)クロマトグラフィー			
① Val-Thr-Leu (画分B)	0.009	0.06	同上
② Val-Tyr-Pro (画分C)	0.006	0.04	同上

## 【0032】1. イオン交換

グロビン蛋白分解物10重量%水溶液を、弱酸性陽イオン交換樹脂(アンバーライトHC50, オルガノ(株), H<sup>+</sup>型)に加え、1時間攪拌して吸着させた後、未吸着画分を得た。

## 2. 限外濾過

イオン交換処理により得られた未吸着画分について、攪拌型限外濾過装置(アドバンテック(株)製, UHP 90K)、限外濾過膜(アドバンテック(株)製, U1H-1, 画分分子量1000)により限外濾過を行い濾液を採取した。

## 3. 逆相(酸性)クロマトグラフィー(図2)

装置 : 高速液体クロマトグラフ(株)島津製作所, LC-10A型)

カラム : SuperPac Pep-5, 15  $\mu$ m, 22.5 $\times$ 250mm, フアルマシア(株)製

溶出溶媒 : 0.1%トリフルオロ酢酸を含有するアセトニトリル水溶液、アセトニトリル濃度2%から35%まで直線的濃度勾配、アセトニトリル濃度は1%/分で変化させる。

【0033】流速 : 5ml/分

温度 : 40 $^{\circ}$ C

検出 : 220nm

分取時間 画分A : 39.9分~40.4分

画分A' (配列番号1) : 53.8分~54.5分

## 4. 逆相(中性)クロマトグラフィー(図3)

装置 : 高速液体クロマトグラフ(株)島津製作所, LC-10A型)

カラム : SuperPac Pep-5, 15  $\mu$ m, 22.5 $\times$ 250mm, フアルマシア(株)製

溶出溶媒 : 20mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH6.5)を含有するアセトニトリル水溶液、アセトニトリル濃度0%~25%まで直線的濃度勾配、アセトニトリル濃度0.5%/分で変化させる。

【0034】流速 : 5ml/分

温度 : 40 $^{\circ}$ C

検出 : 紫外吸収(220nm)

分取時間 : ①画分B 41.7分~43.2分 (Val-Thr-Leu)

②画分C 45.8分~51.0分 (Val-Thr-Pro)

【実施例2】血中T G濃度上昇抑制ペプチドの定製

参考例で得たグロビン蛋白分解物中の血中T G濃度上昇

10 抑制活性を有するペプチド画分の定量を実施例1に示した有効ペプチドの精製法に準じて行った。

## 酸加水分解

蛋白量3~5mgに対して、最終濃度6N 塩酸1mlを試験管に入れ、ニンヒドリン法の場合は常圧下、アミノ酸分析の場合は減圧下に封管し、110 $^{\circ}$ C, 22時間加熱した。

## ニンヒドリン法

加水分解後の検体を水酸化ナトリウムによりpH5.0に調整し、0.2Mクエン酸緩衝液(pH5.0)を含有したニンヒドリン試薬を用いて110 $^{\circ}$ C、15分間反応させ、570nmにおける吸光度を測定した。別に、標準溶液としてL-ロイシン水溶液(0.75, 150, 225, 300nmol/ml)についてニンヒドリン反応を行い、得られた吸光度から検量線を求め、検体のL-ロイシン相当アミノ基量を算出した。

## ペプチドマップ(図3)

装置 : 高速液体クロマトグラフ(株)島津製作所, LC-6A型)

カラム : Shim-pack ISC-07/S1504 Na, 7  $\mu$ m, 4.0 $\times$ 150mm, (株)島津製作所製

溶出溶媒 : 島津製作所(株)製アミノ酸移動相キット(Na型)

流速 : 0.3 ml/分

温度 : 55 $^{\circ}$ C

反応液1 : 島津製作所(株)製分析キットOPA 試薬

検出 : 蛍光吸収(Ex 348nm, Em 450nm)

## 標準溶液

アミノ酸混合標準液18成分H型(和光純薬工業(株))を0.2Mクエン酸緩衝液(pH2.20)により25倍希釈後、10  $\mu$ l注入した(各アミノ酸1nmol/10  $\mu$ l)。

## 検体溶液

酸加水分解後、溶液をロータリーエバポレーターにより濃縮乾固し、さらに減圧下12時間以上乾燥させ、完全に塩酸を除去した。次に、各アミノ酸含量が100nmol/ml程度となるよう0.2Mクエン酸緩衝液(pH2.20)に溶解し、0.45  $\mu$ m フィルター濾液を10  $\mu$ l注入した。アミノ酸の同定とピーク面積算出をクロマトパックC-R4A(株)島津製作所製により解析した。アミノ酸量の算出は、標準溶液との面積比により求めた。アミノ酸組成は、得られたアミノ酸含量の合計に対する各アミノ酸量の比率により算出した。

【0035】結果は、収率として上記表2に記載した。  
 [実施例3] 化学合成によるH-Val-Thr-Leu-OHの調製  
 SAM2ペプチド合成装置(Bioscience社製)により、同装置のプロトコルに従ってH-Val-Thr-Leu-OHを合成した。すなわち、1gあたり0.3mmolの3番目の保護アミノ酸Boc-Leu-OHを結合したアシルオキシメチル樹脂2gを上記ペプチド合成装置の反応容器にセットし、45v/v%トリフルオロ酢酸(TFA)、2.5v/v%アニソール、52.5v/v%塩化メチレン(DCM)を含むデブロック液と20分間接触させて、Boc基を除いた。DCMによる洗浄の後、10v/v%ジイソプロピルエチレンアミンを含むDCMによって樹脂を中和し、これをさらにDCMにより洗浄した。その後、4.0mmolのジイソプロピルカルボジミド(それぞれ理論当量の6.7倍)を含む20mlのDCMとジメチルホルムアミド(DMF)の混合液中で2時間室温にて反応せしめた。かかるDMFとDCMで順次洗浄して、Boc-Thr(Bz)-Leu-PAM樹脂を得た。

【0036】次に同様の工程に従い、Boc-Val-OHをカップリングした。上記のようにカップリングした保護ペプチド樹脂を10v/v%アニソールを含む無水フッ化水素中で1時間・0℃にて反応させた後、フッ化水素を留去してエーテルによる洗浄を行った。得られたペプチド及び樹脂の混合物から、50%酢酸にてペプチドを抽出し、凍結乾燥によって約250mgの粗ペプチドを得た。

【0037】当該粗ペプチドを0.1%TFAに溶解した後、オクタデシルシリカ(ODS)カラム(Cosmosil 5C18, 250×20mm; ナカライテスク社製)により、0.1%のTFAを含むアセトニトリルの直線的濃度勾配(20~70%/50分, 10ml/分)にて展開した。目的とするペプチドは、アセトニトリルの濃度約50%にて溶出された。

[実施例4] 化学合成による配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドの合成  
 上記SAM2ペプチド合成装置により、同装置のプロトコルに従って配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドを合成した。すなわち、1gあたり0.3mmolの3番目の保護アミノ酸Boc-Thr(Bz)-OHを結合したアシルオキシメチル樹脂2gを上記ペプチド合成装置の反応容器にセットし、45v/v%トリフルオロ酢酸(TFA)、2.5v/v%アニソール、52.5v/v%塩化メチレン(DCM)を含むデブロック液と20分間接触させて、Boc基を除いた。DCMによる洗浄の後、10v/v%ジイソプロピルエチレンアミンを含むDCMによって樹脂を中和し、これをさらにDCMにより洗浄した。その後、4.0mmolのBoc-Trp-OH及びジイソプロピルカルボジミド(それぞれ理論当量の6.7倍)を含む20mlのDCMとDMFの混合液中で2時間室温にて反応せし

めた。かかるDMFとDCMで順次洗浄して、Boc-Trp-Thr(Bz)-PAM樹脂を得た。

【0038】次に同様の工程に従い、Boc-Pro-OH、Boc-Tyr(BrZ)-OH、Boc-Val-OH、Boc-Val-OH及びBoc-Leu-OHを順次カップリングした。以下、上記実施例3に従ってペプチドを抽出し、凍結乾燥によって約500mgの粗ペプチドを得た。また、実施例3に従い、当該粗ペプチドをODSカラムで展開すると、目的とするペプチドはアセトニトリルの濃度約30%にて溶出された。

[実施例5] 本発明ペプチド等を含む食品の調製

(1) ①100gの小児用粉ミルクに実施例5で合成したH-Val-Thr-Leu-OHを0.1g添加して、血中T-G濃度上昇抑制能を有する粉ミルクを調製した。

【0039】②100gの小児用粉ミルクに実施例6で合成した配列番号1に示されたアミノ酸配列を有するペプチドを0.1g添加して、血中T-G濃度上昇抑制能を有する粉ミルクを調製した。

(2) ①100gのチョコレートに実施例5で合成したH-Val-Thr-Leu-OHを0.5g添加して、血中T-G濃度上昇抑制能を有するチョコレート調製した。

【0040】②100gのチョコレートに実施例6で合成した配列番号1に示されたアミノ酸配列を有するペプチドを0.5g添加して、血中T-G濃度上昇抑制能を有するチョコレート調製した。

[実施例6] 本発明ペプチド等を含む飼料の調製  
 ビタミン、ミネラル等が配合されたプレミックスに実施例5で合成したH-Val-Thr-Leu-OHと配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを1重量%の割合でそれぞれ別個に配合して、それぞれの当該プレミックスを市販の養魚用飼料に10%の割合で添加して、血中T-G濃度上昇抑制能を有する養魚用飼料を調製した。

〔試験例1〕血中T-G濃度上昇抑制剤(化学合成品)の効果(in vivo)

実施例5に示した方法によって合成した本発明ペプチドである3種の血中T-G上昇抑制ペプチドである、配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有するペプチド及びVal-Thr-LeuおよびVal-Tyr-Proにつきin vivo 脳脂肪荷時の血清T-G上昇に及ぼす効果を検討した。試験は健康なアルビノマウス(5~10週齢、体重約20~30g)を用いて行った。このマウスにオリーブ油250mgと共に上記ペプチド溶液を経口投与した。3時間後、ネブタール麻酔下で血液を採取し、当該血液を分画後、血中T-G濃度を測定した。結果を表2に示す。

【0041】

【表2】

表2 血中T G濃度の測定

投与量 (mg/mouse)	血中T G濃度の上昇率(%)			
	蛋白分解物	Val-Tyr-Pro	Val-Thr-Leu	配列番号1
$1 \times 10^{-1}$				14
$1 \times 10^{-2}$				33
$4 \times 10^{-3}$				33
$1 \times 10^{-3}$				65
0.1		39	30	
0.2		50	33	
1.0		50	73	
2.5		68	75	
5.0		75	79	
20	40			
40	55			
60	82			
80	86			
1 D <sup>55</sup> *	28	0.34	0.43	$5.6 \times 10^{-4}$
比活性	1	82	65	50000

\*1: 50%抑制量(mg/mouse)

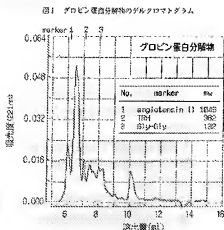
【0042】その結果、3種の血中TG濃度上昇抑制ペプチドはいずれも血中TG濃度の上昇を抑制した。特に配列番号1で示すアミノ酸配列を有するペプチドは、蛋白分解物のペプチドの50000倍の比活性を示した。一方、他の2種のペプチドは、前記ペプチドの約1/100の比活性であったが、蛋白分解物の50倍以上の比活性を有していた。

【試験例2】本発明ペプチド等の安全性試験  
雄雄のICR系マウスに本発明ペプチドである配列番号1に示したアミノ酸配列を有するペプチド、Val-Tyr-Pro及びVal-Thr-Leuの投与割合を変更しつつ(0:1, 1:1, 1:0)、10g/Kg体重以上(投与可能最大量)それぞれ経口投与を行ったが死亡例はなかった。

【0043】

【発明の効果】本発明により、血中トリグリセリド濃度上昇抑制ペプチド並びに当該ペプチド等を有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤、血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した特定保健用食品(いわゆる機能性食品)及び血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した飼料が提供される。

【図1】



【図2】

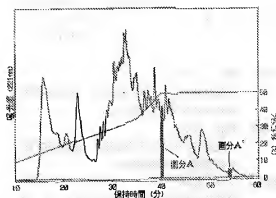
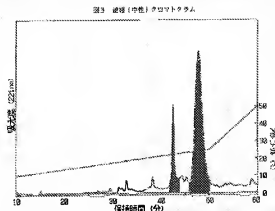


図2 グロビン蛋白分解物の逆相(陰性)クロマトグラム

【図3】



## 【手続補正書】

【提出日】平成6年4月7日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0035】結果は、収率として上記表2に記載した。

〔実施例3〕化学合成によるH-Val-Thr-Leu-OHの調製

SAM2ペプチド合成装置（Biosearch社製）により、同装置のプロトコールに従ってH-Val-Thr-Leu-OHを合成した。すなわち、1gあたり0.3mmolの3番目の保護アミノ酸Boc-Leu-OHを結合したアシルオキシメチル樹脂2gを上記ベ

ブチド合成装置の反応容器にセットし、4.5v/v%トリプレオ酢酸（TFA）、2.5v/v%アニソール、52.5v/v%塩化メチレン（DCM）を含むデブロック液と20分間接触させて、Boc基を除いた。DCMによる洗浄の後、10v/v%ジイソプロピルエチレンアミンを含むDCMによって樹脂を中和し、これをさらにDCMにより洗浄した。その後、4.0mmolのBoc-Thr-OH及びジイソプロピルカルボジイミド（それぞれ理論当量の6.7倍）を含む20mlのDCMとジメチルホルムアミド（DMF）の混合液中で2時間室温にて反応せしめた。かかる後、DMFとDCMで順次洗浄して、Boc-Thr(Bz)-Leu-PAM樹脂を得た。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup> 識別記号 庁内整理番号  
// A23K 1/18 B 9123-2B  
I02 A 9123-2B

F I 技術表示箇所

(72)発明者 福浜 千津子  
大阪府池田市古江町180番地 阪急共栄物  
産株式会社薬理研究所内  
(72)発明者 松高 寿子  
大阪府池田市古江町180番地 阪急共栄物  
産株式会社薬理研究所内  
(72)発明者 中村 豊郎  
茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1-2 伊  
藤ハム株式会社中央研究所内

(72)発明者 沼田 正寛  
茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1-2 伊  
藤ハム株式会社中央研究所内  
(72)発明者 渡辺 重明  
茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1-2 伊  
藤ハム株式会社中央研究所内  
(72)発明者 本田 和久  
茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1-2 伊  
藤ハム株式会社中央研究所内



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発日】平成9年（1997）6月17日

【公開番号】特開平7-188284

【公開日】平成7年（1995）7月25日

【年通号数】公開特許公報7-1883

【出願番号】特願平5-337885

【国際特許分類第6版】

C07K 7/06

A23K 1/16 303

A23L 1/305

A61K 38/00 ADN

// A23K 1/18

102

【F1】

C07K 7/06 8517-4H

A23K 1/16 303 F 8502-2B

A23L 1/305 9359-4B

A23K 1/18 B 8502-2B

102 A 8502-2B

A61K 37/02 ADN 9051-4C

【手続補正書】

【提出日】平成8年10月15日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正内容】

【0034】流速 : 5ml/分

温度 : 40℃

検出 : 紫外吸収 (220nm)

分取時間 : ①画分B 41.7分~43.2分 (Val-Thr-Leu)

②画分C 45.8分~51.0分 (Val-Thr-Pro)

【実施例2】血中TG濃度上昇抑制剤ペプチドの定量

参考例で得たグロビン蛋白分解物中の血中TG濃度上昇

抑制活性を有するペプチド画分の定量を実施例1に示し

ペプチドマップ

装置 : 高速液体クロマトグラフ ( (株) 島津製作所, LC-6A型)

カラム : Shim-pack ISC-07/S1504 Na, 7  $\mu$ m, 4.0 $\times$ 150mm, (株) 島津製作

所製

溶出溶媒 : 島津製作所 (株) 製アミノ酸移動相キット (Na型)

流速 : 0.3 ml/分

温度 : 55℃

反応液1 : 島津製作所 (株) 製分析キットOPA 試薬

検出 : 蛍光吸収 (Ex 348nm, Em 450nm)

標準溶液

アミノ酸混合標準液18成分 H型 (和光純薬工業 (株))

を0.2Mクエン酸緩衝液 (pH2.20) により25倍希釈後、10

た有効ペプチドの精製法に準じて行った。

酸加水分解

蛋白質3~5mgに対して、最終濃度6N 塩酸1mlを試験管に入れ、ニンヒドリン法の場合は常圧下、アミノ酸分析の場合は減圧下にて封管し、110℃, 22時間加熱した。

ニンヒドリン法

加水分解後の検体を水酸化ナトリウムによりpH5.0に調整し、0.2Mクエン酸緩衝液 (pH5.0) を含有したニンヒドリン試薬を用いて 110℃、15分間反応させ、570nmにおける吸光度を測定した。別に、標準溶液としてL-ロイシン水溶液 (0.75, 150, 225, 300nmol/ml) についてニンヒドリン反応を行い、得られた吸光度から検量線を求め、検体のL-ロイシン相当アミノ量を算出した。

$\mu$ l 注入した (各アミノ酸1nmol/10 $\mu$ l)。

検体溶液

酸加水分解後、溶液をロータリーエバポレーターにより

濃縮乾燥し、さらに減圧下12時間以上乾燥させ、完全に塩酸を除去した。次に、各アミノ酸含量が100nmol/g程度となるよう0.2Mクエン酸緩衝液 (pH2.20) に溶解し、0.45μm フィルター濾液を10μl 注入した。アミノ酸の測定とピーク面積算出をクロマトバックC-R4A (株) 島津製作所製) により解析した。アミノ酸量の算出は、標準溶液との面積比により求めた。アミノ酸組成は、得られたアミノ酸含量の合計に対する各アミノ酸量の比率により算出した。

#### 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正内容】

【0035】結果は、収率として上記表1に記載した。

【実施例3】化学合成によるH-Val-Thr-Leu-OHの調製  
SAM2ペプチド合成装置(Bioscience社製)により、同装置のプロトコールに従ってH-Val-Thr-Leu-OHを合成した。すなわち、1gあたり0.3mmolの3番目の保護アミノ酸Boc-Leu-OHを結合したアシルオキシメチル樹脂2gを上記ペプチド合成装置の反応容器にセットし、45v/v%トリフルオロ酢酸(TFA)、2.5v/v%アニソール、52.5v/v%塩化メチレン(DCM)を含むデブロック液と20分間接触させて、Boc基を除いた。DCMによる洗浄の後、10v/v%ジソプロピルエチレンアミンを含むDCMによって樹脂を中和し、これをさらにDCMにより洗浄した。その後、4.0mmolのBoc-Thr-OH及びジソプロピルカルボジミド(それぞれ理論当量の6.7倍)を含む20mlのDCMとジメチルホルムアミド(DMF)の混合液中で2時間室温にて反応せしめた。かかる後、DMFとDCMで順次洗浄して、Boc-Thr(Bz)-Leu-PAM樹脂を得た。

#### 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正内容】

【0038】次に同様の工程に従い、Boc-Pro-OH、Boc-Tyr(Bz)-OH、Boc-Val-OH、Boc-Leu-OH及びBoc-Leu-OHを順次カップリングした。以下、上記実施例3に従ってペプチドを抽出し、凍結乾燥によって約500mgの粗ペプチドを得た。また、実施例3に従い、当該粗ペプチドを0.15カラムで展開すると、目的とするペプチドはアセトニトリルの濃度約30%にて溶出された。

【実施例5】本発明ペプチド等を含む食品の調製

(1) ①100gの小児用粉ミルクに実施例3で合成したH-Val-Thr-Leu-OHを0.1g添加して、血中T G濃度上昇抑制能を有する粉ミルクを調製した。

#### 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正内容】

【0039】②100gの小児用粉ミルクに実施例4で合成した配列番号1に示されたアミノ酸配列を有するペプチドを0.1g添加して、血中T G濃度上昇抑制能を有する粉ミルクを調製した。

(2) ①100gのチョコレートに実施例3で合成したH-Val-Thr-Leu-OHを0.5g添加して、血中T G濃度上昇抑制能を有するチョコレートを調製した。

#### 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正内容】

【0040】①100gのチョコレートを実施例4で合成した配列番号1に示されたアミノ酸配列を有するペプチドを0.5g添加して、血中T G濃度上昇抑制能を有するチョコレートを調製した。

【実施例6】本発明ペプチド等を含む飼料の調製  
ビタミン、ミネラル等が配合されたプレミックスに実施例3で合成したH-Val-Thr-Leu-OHと配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを1重量%の割合でそれぞれ別個に配合して、それぞれの当該プレミックスを市販の養魚用飼料に10%の割合で添加して、血中T G濃度上昇抑制能を有する養魚用飼料を調製した。

【試験例1】血中T G濃度上昇抑制剤(化学合成品)の効果 (in vivo)

実施例4に示した方法によって合成した本発明ペプチドである3種の血中T G上昇抑制ペプチドである、配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有するペプチド及びVal-Thr-LeuおよびVal-Tyr-Proにつき in vivo 脂肪負荷時の血清T G上昇に及ぼす効果を検討した。試験は健康なアルビノマウス(5~10週齢、体重約20~30g)を用いて行った。このマウスにオリーブ油250mgと共に上記ペプチド溶液を経口投与した。3時間後、ネブプタール麻酔下で血液を採取し、当該血液を分離後、血中T G濃度を測定した。結果を表2に示す。

Machine translation of Citation 18 obtained from JPO web site

(11)Publication number : 07-188284  
(43)Date of publication of application : 25.07.1995

---

(51)Int.Cl. C07K 7/06  
A23K 1/16  
A23L 1/305  
A61K 38/00  
// A23K 1/18  
A23K 1/18

---

---

(21)Application number : 05-337885 (71)Applicant : ITO HAM KK  
HANKYU KYOEI BUSSAN  
INC  
(22)Date of filing : 28.12.1993 (72)Inventor : KAGAWA KYOICHI  
FUKUHAMA CHIZUKO  
MATSUTAKA TOSHIKO  
NAKAMURA TOYORO  
NUMATA MASAHIRO  
WATANABE SHIGEAKI  
HONDA KAZUHISA

---

**(54) PEPTIDE CAPABLE OF SUPPRESSING RISE IN TRIGLYCERIDE LEVEL IN BLOOD AND SUPPRESSOR FOR RISE IN TRIGLYCERIDE LEVEL IN BLOOD CONTAINING THE SAME PEPTIDE AS ACTIVE INGREDIENT**

**(57)Abstract:**

PURPOSE: To obtain a new peptide useful as a suppressor, etc., for a rise in glyceride level in blood without any side effects.

CONSTITUTION: This peptide has an amino acid sequence expressed by the formula. Furthermore, the peptide is obtained by preparing a gene having a base sequence corresponding to the peptide sequence, integrating the resultant gene in a suitable expression vector and expressing the gene in a suitable host. The sequence Val-Tyr-Pro or Val-Thr-Leu or both are useful as a suppressor for a rise in triglyceride level in blood.

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr

[Claim(s)]

[Claim 1]Peptide whose amino acid sequence is the array number 1.

[Claim 2]A triglyceride concentration rise depressant in blood in which an amino acid sequence contains peptide, Val-Tyr-Pro, and/or Val-Thr-Leu which are the array numbers 1 as an active principle.

[Claim 3]A food for specified health use which gave a triglyceride concentration rise restraining function in blood which contains peptide and Val-Tyr-Pro, and/or Val-Thr-Leu whose peptide whose amino acid sequence is array number 1 or amino acid sequence is the array number 1 as an active principle.

[Claim 4]Feed which gave a triglyceride concentration rise restraining function in blood which contains peptide and Val-Tyr-Pro, and/or Val-Thr-Leu whose peptide whose amino acid sequence is array number 1 or amino acid sequence is the array number 1 as an active principle.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application]The triglyceride concentration rise depressant in blood which contains triglyceride concentration rise control peptide in blood with new this invention, the peptide concerned, etc. as an active principle, It is related with the feed which gave the food for specified health use (what is called functional food) which gave the triglyceride concentration rise restraining function in blood, and the triglyceride concentration rise restraining function in blood.

[0002]Prevention and the therapies of a circulatory system disease, such as a person or obesity and the hyperlipidemia of an animal and hypertension accompanying them, and arteriosclerosis, are attained by fat blood serum \*\*\*\*\* by administration of this invention triglyceride concentration rise depressant. The fleshy improvement in livestock or a farmed fish is attained.

[0003]

[Description of the Prior Art]If a fat and sugar are taken in superfluously, becoming a cause of obesity or hyperlipidemia is known. And it is said that the rise of the triglyceride (it may be hereafter indicated as TG) concentration in blood in hyperlipidemia becomes a cause which causes hypertension and arteriosclerosis. Then, many trials which control the rise of the blood drug concentration of TG and improve obesity and hyperlipidemia are made now.

[0004]In order to control the rise of the blood drug concentration of TG now, ingestion of dietary restriction or slimmer's meal (for example, fiber) and administration of further various kinds of drugs are performed. As the drugs concerned, the dextran sulfate which improves the lipoprotein lipase activity in blood, for example, the nicomol which controls lipid absorption, clofibrate which is lipid metabolism improving agents, Brava statin, etc. are used now.

[0005]However, dietary restriction is pain for those who do it, and we are anxious also about inducement of the side effects by administration of the above-mentioned drugs. Therefore, it waits for development of TG concentration rise depressant in blood with which us are not anxious about having the rise depressor effect of more powerful TG concentration in blood, and side effects happening. On the other hand, to livestock or a farmed fish, promotion of growth is planned and concentrate feed is given now. It is in the tendency for the abnormalities in the fat metabolism to start into these livestock and farmed fishes as the result, and for the concentration of TG in blood to rise. By the rise of TG concentration in blood, the fat content in livestock or a farmed fish becomes superfluous, and causes excess of fat ingestion. It is stopping moreover, suiting consumers' taste also in respect of the taste. The increase in such fat content is an important problem relevant to the waste problem of feed, the abandonment problem of the fat adhering to a slaughtered body, etc. Therefore, especially the thing for which the rise of TG in blood is controlled is the pressing need in the zootechnics community and fishery community of our country.

[0006]These days, application about the oligopeptide inclusion which one of this invention persons joined and developed is carried out (International-Publication number WO89/06970 gazette), and the analogous art concerned is further indicated to JP,H2-154693,A. It is shown clearly that a certain kind of oligopeptide has a lipid metabolism improvement effect including the rise depressor effect of TG in blood (Kyoichi Kagawa: Japan pharmacology magazine, such as monthly hood chemicals, 6 and 80 (1990), and \*\*\*\* Chizuko, 97, p38 (1991)).

[0007]

[Problem to be solved by the invention]The presentation of the oligopeptide inclusion indicated in the above-mentioned application gazette etc. is a mixture of the decomposition product of protein, and the amino acid sequence of peptide as a true active principle, i.e., an active principle, is not clarified. This has low purity for applying the peptide inclusion concerned as drugs. When it blends with foodstuffs, it becomes difficult to quantify in distinction from peptide in foodstuffs, and there is a problem of a quality control.

[0008]Then, it becomes problem to look for TG concentration rise control peptide in blood as the true active principle of the peptide inclusion concerned, i.e., an active principle. That is, this invention offers problem the feed which gave TG concentration rise depressant in blood which contains analysis, the peptide concerned, etc. of an amino acid sequence of peptide as the above-mentioned active principle as an active principle, the functional food which gave TG concentration rise restraining function in blood, and TG concentration rise restraining function in blood.

[0009]

[Means for solving problem]this invention person found out that an aforementioned problem might be solved by the following invention, as a result of inquiring wholeheartedly for solution of an aforementioned problem. That is, this invention makes the following matters the summary.

(1) Peptide whose amino acid sequence is the array number 1.

[0010](2) The triglyceride concentration rise depressant in blood in which an amino acid sequence contains peptide, Val-Tyr-Pro, and/or Val-Thr-Leu which are the array numbers 1 as an active principle.

(3) The food for specified health use which gave the triglyceride concentration rise restraining function in blood which contains peptide and Val-Tyr-Pro, and/or Val-Thr-Leu whose peptide whose amino acid sequence is array number 1 or amino acid sequence is the array number 1 as an active principle.

[0011] (4) Feed which gave the triglyceride concentration rise restraining function in blood which contains peptide and Val-Tyr-Pro, and/or Val-Thr-Leu whose peptide whose amino acid sequence is array number 1 or amino acid sequence is the array number 1 as an active principle.

Hereafter, this invention is explained in detail. Val-Tyr-Pro and Val-Thr-Leu which have contained as an active principle in the peptide which is this invention peptide, and whose amino acid sequence is the array number 1, and TG concentration rise depressant in this invention blood. It is possible to carry out separation refinement from the protein which exists in the nature (hereafter indicated to be this invention peptide etc.). It is possible to carry out chemosynthesis of this by a direct usually publicly known method. The gene which furthermore has a base sequence corresponding to the above-mentioned peptide sequence can be prepared, and this invention peptide can also be prepared by including this in a suitable expression vector and making the gene concerned reveal in a suitable host.

A. Explain a means which carries out separation refinement of the above-mentioned peptide to below from protein which exists in a nature.

[0012]As raw materials, such as this invention peptide, vegetable albumen, such as animal protein; wheat gluten, such as fish meat protein, fish meal, and globin, and soybean glue, etc. can be used widely. Also in such protein, globin proteins, such as hemoglobin and myoglobin, are preferred especially in a point that an expected effect of controlling a rise of TG concentration in blood can be strongly done so.

[0013]A kind in particular of animal which is a providing source of this globin protein is not limited, but can use widely blood, such as a cow, a swine, a sheep, Homo sapiens, and a horse. Next, it is required to hydrolyze the above-mentioned protein. Operation about the hydrolysis concerned is the above-mentioned International-Publication number. WO89/06970 A method given in a gazette is followed. As hydrolase to be used, one sort of acid protease, neutral protease, or alkaline protease or two sorts or more can be used, for example.

[0014]Conditions at the time of hydrolyzing protein of globin here, etc. are described. First, make it distribute so that it may become 5 to 30weight % in water by making a globin protein inclusion into solid content, and with acid or alkali, adjust to optimal pH of protease and protease is added at once or sequentially, The enzyme concerned can be made to be able to react at temperature of 20-70 °C for 3 to 48 hours, and a hydrolysis reaction can be performed.

[0015]Next, the proteolysis thing which has TG concentration rise depressor effect in blood can be obtained in the proteolysis thing concerned by drying the obtained proteolysis thing by drying and solidifying extenders, such as carboxymethyl cellulose or dextrin, in proper quantity (it is hereafter indicated as a decomposition product). This decomposition product contains the above-mentioned this invention peptide etc. at least 0.1weight %.

[0016]Next, this invention proteolysis thing which performed enzyme treatment here is refined. This purification process can usually adopt a publicly known purification process. That is, the fraction which includes desired peptide can be refined, combining suitably an ion-exchange resin method, an ultrafiltration method, a reversed-phase-chromatography method, etc.

[0017]In the above-mentioned separating mechanism, although the operation by the ion-exchange resin method or an ultrafiltration method is not necessarily indispensable, it is preferred to include in separation and a purification process from a viewpoint that the degree of separation / refining may be raised. Separation and refining are possible by combining the operation in the reversed phase chromatography under acidity, and the reversed phase chromatography under neutrality. The protein volume in a fraction can

usually be measured with the publicly known determination of protein concentration, for example, the ninhydrin method etc.

[0018]And the amino acid sequence of the fraction which was carried out in this way and sorted out can check existence of this invention peptide etc. by usually identifying by a publicly known method. This invention peptide originating in the fraction separated in this way, etc. can be used as an active principle of TG concentration rise depressant in this invention blood.

[0019]The fraction separated by doing in this way can also be used as an active principle of TG concentration rise depressant in direct this invention blood. Furthermore, chemosynthesis of this invention peptide can usually be carried out by a publicly known peptide synthesis method. For example, an azide method, the acid chloride method, an acid anhydride method, a mixed acid anhydride method, DCC method, active ester method, carboimidazole method, oxidation reduction method, and DCC-ADIDIBU (HOMB, HOBt, HOSu) -- law (the 1st volume (1966) of "the peptide (The Peptide)") Schreder&Luhke work, Academic Press, New York, USA; or "peptide synthesis" Izumiya work, and Maruzen Co., Ltd. (1975) -- etc. -- a peptide synthesis method can be illustrated.

[0020]In the above-mentioned peptide synthesis method, either a solid-phase-synthesis method or liquid phase synthesis method can be performed. As for the amino acid which has a side-chain functional group, for example, tyrosine, and threonine, in the describing [ above ] peptide synthesis method, it is preferred to protect the side-chain functional group concerned. As a protective group used for this, a publicly known protective group (Cbz-), for example, a benzyloxycarbonyl group, a t-butoxycarbonyl group (Boc-), benzyl (Bz-), etc. can usually be used.

[0021]The protective group concerned is a publicly known method, and can usually perform deprotection in the synthesizing process of this invention peptide etc.

B. TG concentration rise depressant in blood can be prepared by making this invention peptide etc. into an active principle. As a carrier of the TG concentration rise depressant in blood concerned, each excipients or diluents, such as a bulking agent, an extender, a binding material, moisture adhesive material, disintegrator, a surface active agent, etc. which are usually commonly used although the pharmaceutical preparation according to a using form is prepared, can be used. As long as a pharmaceutical preparation presentation form is a form in which this contains this invention peptide etc. effectively, there may not be any limitation in particular, for example, they may be \*\* agents, such as a tablet, powders, a granule, and a pill. It can also be considered as injections forms, such as liquids and solutions, suspension, and an emulsion. This can also be made into the dry article



which can be made by addition of a carrier suitable before use as it is liquefied. Each can prepare these in accordance with a conventional method.

[0022]The dose of TG concentration rise depressant in blood obtained in this way is suitably chosen according to the medication method of the pharmaceutical preparation concerned, a dosage form, the condition of the patient who prescribes a medicine for the patient, etc. It is preferred that generally prepare this invention peptide etc. to the formulation containing about about 0.001 to 80 weight %, and the quantity of this invention peptide etc. which are contained in the pharmaceutical preparation concerned prescribes a medicine for the patient in the range used as about 1 mg - about 100 mg per one day adult. The administration concerned does not necessarily need to be one day, and can also divide and medicate three to four days.

[0023]In the suitable route of administration [ medicinal preparation / of the various above-mentioned forms ] according to the form, for example, an injections form, the medicinal preparation of a \*\* agent form may be prescribed for the patient by intraperitoneal injection etc. by internal use etc. intramuscular, hypodermic, and in leather in a vein.

C. A food for specified health use (what is called functional food) can be prepared by making this invention peptide etc. into an active principle. The peptide concerned can also be used as a food additive of common foodstuffs.

[0024]It is possible for it not to be limited especially as a kind of the above-mentioned foodstuffs, but to apply to milk, a pudding, curry, HAYASHI, a stew, meat sauce, a ham, a cake, chocolate, etc. As for especially milk, in the point that ingestion of difficult this invention peptide etc. can be made easy in respect of the taste, it is preferred that a child takes in directly. It is preferred to add this invention peptide etc. for foodstuffs which promote obesity essentially, such as a cake and chocolate, in the point that obesity by ingestion of the foodstuffs concerned can be prevented.

[0025]The loadings in the above-mentioned foodstuffs, such as this invention peptide, are suitably chosen according to the kind of foodstuffs, the purpose to add, the effect expected by ingestion of the foodstuffs concerned, etc. Generally, it is preferred to make the grade which can take in 0.1 mg - about 4 mg per meal contain this invention peptide etc. in the above-mentioned foodstuffs by conversion, such as this invention peptide.

D. By blending this invention peptide etc. with feed, feed in which rise control ability of TG concentration in blood, such as livestock, was given can be prepared.

[0026]Feed in which this invention peptide etc. are blended does not ask \*\* which are feed for farmed fishes, such as Thailand and a yellowtail, as they are rations for livestock, such

as a cow, a pig, and a hen. Loadings to inside of feed, such as this invention peptide, are suitably chosen according to an effect etc. which are expected by a kind of feed, and ingestion of the feed concerned. Generally, it is preferred to blend at 0.1 to 4weight % of a rate by conversion, such as this invention peptide, into feed.

[0027]

[Working example]An working example etc. are indicated below and this invention is explained to it still more concretely. However, technical scope of this invention is not limited by this example etc.

A [reference example] Details of a process which used a bovine red cell below for manufacture of a globin proteolysis thing are shown. Molecular weight distribution was investigated using a gel-filtration-chromatography method (drawing 1).

[0028]The chromatography concerned was carried out on condition of the following.

Equipment : High-speed liquid chromatograph ( . ) Shimadzu and LC-6A type column : P. olyHYDROXYETHYL A, 5 micrometer, 9.4x200 mm, the product elution solvent made from PolyC Inc:50mM formic acid rate of flow : It detects by 0.5-ml/. : Ultraviolet absorption (221 nm) Add the water 250l to 100 kg of fresh bovine red cells, and it is made to hemolyze enough, After adding phosphoric acid and adjusting pH to 2.8, the acid protease  $2.6 \times 10^7$  unit of Aspergillus niger was added, and 50 \*\* was made to react for 3 hours.

[0029]After heating reaction mixture for 30 minutes at 80 \*\* and stopping a reaction after a reaction, the aqueous suspension of calcium hydroxide was added, pH was adjusted to 6.5, 10 kg of diatomite was added, spray drying of the filtrate obtained by filtering using the filter press was carried out, and 23-kg powder was obtained.

[Working example 1]. Fractionation purification method this invention peptide of TG concentration rise control peptide in blood is shown in the following working example. 1. Ionic exchange and 2. An ultrafiltration and 3. Separation by the reverse phase column chromatography under acidity, and 4. The procedure of separation by the reversed phase chromatography under neutrality was acquired later on.

[0030]The recovery rate at the time of using these operations was shown in Table 1. The protein volume was measured by the NINHIDORI method.

[0031]

[Table 1]

表1 脂肪結晶化抑制ペプチドのグロビン蛋白分解物からの回収率

画 分	蛋白質量(g)	収率(%)	定 量 法
グロビン蛋白分解物	13.7	100	酸加水分解後 <sup>2</sup> HPLC法
1) 交換+除外濾過	4.24	30.9	同上
逆相(酸性) HPLC法			
①画分 A	0.039	0.28	酸加水分解後 <sup>2</sup> HPLC分析
②画分 A'	0.0005	0.004	同上
逆相(中性) HPLC法			
③ Val-Thr-Leu (画分 B)	0.009	0.06	同上
④ Val-Tyr-Pro (画分 C)	0.006	0.04	同上

[0032] 1. The unadsorbed fraction was obtained, after having added 10 weight % of ionic exchange globin proteolysis thing solution to weakly-acidic-cation-exchange-resin (Amberlite IRC50, ORGANO,  $H^+$  type), stirring it for 1 hour and making it adsorb.

2. About the unadsorbed fraction obtained by ultrafiltration ion exchange treatment, they are stirred type ultrafiltration equipment (Product made from ADVANTEC, UHP 90K), and ultrafiltration membrane. (Product made from ADVANTEC, UIIH-1, cut off molecular weight 1000) The ultrafiltration was performed and filtrate was extracted.

### 3. Opposite phase (acidity) Chromatography (drawing 2)

equipment :high-speed liquid chromatograph ( Shimadzu, LC-10A type) column : SuperPac Pep-S, 15 micrometer, 22.5x250 mm, and Pharmacia Co., Ltd. -- make elution solvent: -- the acetonitrile solution which contains trifluoroacetic acid 0.1%. A linear concentration gradient and acetonitrile concentration are changed by a part for 1% from 2% of acetonitrile concentration to 35%.

[0033]The rate of flow It is temperature by :5-ml/. : 40 \*\* detection : 220-nm preparative isolation time Fraction A : 39.9 minute -40.4 minute fraction A'(array number 1):53.8 minute -54.5 minute 4. Opposite phase (neutrality) Chromatography (drawing 3)

equipment :high-speed liquid chromatograph ( Shimadzu and LC-10A type) column : SuperPac Pep-S, 15 micrometer, 22.5x250 mm, and Pharmacia Co., Ltd. -- make elution solvent: -- 20mM ammonium acetate buffer solution (pH 6.5). It is made to change by a part for linear concentration gradient and 0.5% of acetonitrile concentration/to the acetonitrile solution to contain and 0% - 25% of acetonitrile concentration.

[0034]The rate of flow It is temperature by :5-ml/. : 40 \*\* detection : Ultraviolet absorption . (220 nm) Preparative isolation time : \*\* fraction B 41.7 minutes -, 43.2 minute . (Val-Thr-Leu) A fixed quantity of a peptide fraction which has TG concentration rise inhibiting activities in blood in the globin proteolysis thing obtained by the fixed-quantity reference example of TG concentration rise control peptide in \*\* fraction C 45.8 minutes -, and the 51.0 minute (Val-Thr-Pro) [working-example 2] blood. It carried

out according to the purification method of the effective peptide shown in the working example 1.

To the acidolysis protein volume of 3-5 mg, 1 ml of last concentration 6N chloride was put into the test tube, under ordinary pressure, the sealed tube of the case of the ninhydrin method was carried out under decompression, and, 110 \*\* in the case of amino acid analysis, it heated for 22 hours.

The sample after ninhydrin method hydrolysis is adjusted the pH to 5.0 with sodium hydroxide, and the ninhydrin reagent containing 0.2M citrate-buffer-solution (pH 5.0) is used. It was made to react for 15 minutes and 110 \*\* of absorbances at 570 nm were measured. The analytical curve was searched for from the absorbance independently obtained by performing a ninhydrin reaction as a standard solution about L-leucine solution (0.75, 150, 225, 300 nmoles/ml), and the L-leucine equivalent amino group amount of the sample was computed.

Peptide map (drawing 3) equipment : High-speed liquid chromatograph . ( Shimadzu, LC-6A type) Column : Shim-pack ISC-07/S1504. Na, 7 micrometer, and 4.0x150 mm, Co., Ltd. -- Shimadzu Shimadzu elution solvent: Co., Ltd. -- make amino-acid mobile-phase kit (Na type) rate-of-flow : a part for 0.3 ml/-- temperature : 55 \*\* reaction mixture 1: -- Shimadzu Co., Ltd. -- Make analysis kit OPA reagent detection : 18 ingredients of fluorescence absorption (Ex 348nm, Em 450nm) standard solution amino acid mixing reference solution H type (Wako Pure Chemical Industries [ ] -- Co., Ltd.). of which 10microl pouring was done after 25 time dilution with 0.2M citrate buffer solution (pH 2.20) (each amino acid 1nmoles/10microl).

After sample solution acidolysis, concentration hardening by drying was carried out by the rotating evaporator, the solution was further dried under decompression for 12 hours or more, and chloride was removed thoroughly. Next, it dissolved in 0.2M citrate-buffer-solution (pH 2.20) so that each amino acid content might be set to 100 nmolse(s)/about ml, and 10microl pouring of 0.45-micrometer filter filtrate was done. They are identification of amino acid, and peak area calculation Chromato pack C-R 4A (made by Shimadzu) It analyzed. It asked for calculation of the amount of amino acid by surface ratio with a standard solution. Amino acid composition was computed with the ratio of each amount of amino acid to the sum total of the obtained amino acid content.

[0035] The result was indicated to the above-mentioned table 2 as yield.

[Working example 3] According to the protocol of the equipment, H-Val-Thr-Leu-OH was compounded with the preparation SAM2 peptide-synthesis equipment (made by Biosearch) of H-Val-Thr-Leu-OH by chemosynthesis. Namely, the acyloxy methyl resin 2g which

combined 3rd protection amino acid Boc-Leu-OH of 0.3mmol perg is set to the reaction vessel of the above-mentioned peptide synthesis equipment, The Dev Locke solution containing 45 v/v% trifluoroacetic acid (TFA), a 2.5 v/v% anisole, and a 52.5 v/v% methylene chloride (DCM) was made to contact for 20 minutes, and the Boc basis was removed. DCM containing 10 v/v% diisopropylethylene amine neutralized resin after washing by DCM, and DCM washed this further. Then, you made it react to 20-ml DCM containing the diisopropylcarbodiimide (respectively 6.7 times of the theoretical equivalent) of 4.0mmol at a room temperature in the mixed liquor of dimethylformamide (DMF) for 2 hours. It washed one by one by this DMF and DCM, and Boc-Thr(Bz)-Leu-Pulse Amplitude Modulation resin was obtained.

[0036]Next, coupling of Boc-Val-OH was carried out according to the same process. After making the protection peptide resin which carried out coupling as mentioned above react at 1 hour and 0 \*\* in anhydrous hydrogen fluoride containing a 10 v/v% anisole, hydrogen fluoride was distilled off and washing by ether was performed. Acetic acid extracted peptide 50% and about 250 mg of rough peptide was obtained from the mixture of the obtained peptide and resin by freeze-drying.

[0037]After dissolving the rough peptide concerned in TFA 0.1%, with an octadecyl silica (ODS) column (250x20 mm; Cosmosil 5C<sub>18</sub>, Nacalai Tesque, Inc. make). It developed in the linear concentration gradient (a part for 20 to 70%/50-minute, and 10-ml/) of acetonitrile containing 0.1% of TFA. Target peptide was eluted by about 50% of the concentration of acetonitrile.

[Working example 4] The peptide which has an amino acid sequence shown in the array number 1 according to the protocol of the equipment with the synthetic above-mentioned SAM2 peptide-synthesis equipment of the peptide which has an amino acid sequence shown in the array number 1 by chemosynthesis was compounded. Namely, the acyloxy methyl resin 2g which combined 7th protection amino acid Boc-Thr(Bz)-OH of 0.3mmol perg is set to the reaction vessel of the above-mentioned peptide synthesis equipment, The Dev Locke solution containing 45 v/v% trifluoroacetic acid (TFA), a 2.5 v/v% anisole, and a 52.5 v/v% methylene chloride (DCM) was made to contact for 20 minutes, and the Boc basis was removed. DCM containing 10 v/v% diisopropylethylene amine neutralized resin after washing by DCM, and DCM washed this further. Then, Boc-Trp-OH and the diisopropylcarbodiimide (respectively 6.7 times of the theoretical equivalent) of 4.0mmol You made it react at a room temperature for 2 hours in the mixed liquor of 20 ml of DCM and DMF which are included. It washed one by one by this DMF and DCM, and Boc-Trp-Thr(Bz)-Pulse-Amplitude-Modulation resin was obtained.

[0038]Next, according to the same process, coupling of Boc-Pro-OH, Boc-Tyr(BrZ)-OH, Boc-Val-OH, Boc-Val-OH, and Boc-Leu-OH was carried out one by one. Hereafter, peptide was extracted according to the above-mentioned working example 3, and about 500 mg of rough peptide was obtained by freeze-drying. When the rough peptide concerned was developed with the ODS column according to the working example 3, target peptide was eluted by about 30% of the concentration of acetonitrile.

[Working example 5] 0.1g of H-Val-Thr-Leu-OH compounded in working example 5 to the preparation (1) \*\*100g powdered milk for children of the foodstuffs containing this invention peptide etc. was added, and the powdered milk which has TG concentration rise control ability in blood was prepared.

[0039]\*\* 0.1g of peptide which has the amino acid sequence shown in 100 g of powdered milk for children at the array number 1 compounded in working example 6 was added, and the powdered milk which has TG concentration rise control ability in blood was prepared.

(2) 0.5g of H-Val-Thr-Leu-OH compounded in working example 5 in \*\*100g chocolate was added, and the chocolate which has TG concentration rise control ability in blood was prepared.

[0040]\*\* 0.5g of peptide which has the amino acid sequence shown in 100 g of chocolate at the array number 1 compounded in working example 6 was added, and the chocolate which has TG concentration rise control ability in blood was prepared.

[Working example 6] The peptide which has an amino acid sequence expressed with H-Val-Thr-Leu-OH compounded in working example 5 and the array number 1 to the premix which contains the preparation vitamins of the feed containing this invention peptide etc., a mineral, etc. is separately blended at 1weight % of a rate, respectively, It added at a rate of 10% in the feed for fish breeding of marketing of each pre MIKUSSU concerned, and the feed for fish breeding which has TG concentration rise control ability in blood was prepared.

[Example 1 of an examination]. It is TG rise control peptide in three sorts of blood which is this invention peptide compounded by the method shown in the effect (inch vivo) working example 5 of TG concentration rise depressant in blood (chemical composition). The effect exerted on the blood serum TG rise at the time of in vivo fat load per peptide and Val-Thr-Leu which have the amino acid sequence indicated to the array number 1, and Val-Tyr-Pro was examined. The examination was done using the healthy albino mouse (5 - 10-week old, weight of about 20-30g). The above-mentioned peptide solution was administered orally to this mouse with 250 mg of olive oil. Blood was extracted under the Nembutal anesthesia 3 hours afterward, and TG concentration in blood was measured after

separating the blood concerned. A result is shown in Table 2.

[0041]

[Table 2]

表2 血中TG濃度の測定

投与量 (mg/mouse)	血中TG濃度の上昇率(%)			
	蛋白分解物	Val-Tyr-Pro	Val-Thr-Leu	配列番号1
$4 \times 10^{-2}$				44
$1 \times 10^{-1}$				33
$4 \times 10^{-1}$				33
$1 \times 10^{-3}$				65
0.1		38	30	
0.2		50	33	
1.0		50	73	
2.5		69	76	
5.0		79	79	
20	40			
40	55			
60	82			
80	86			
IDD <sup>*)</sup>	28	0.34	0.43	$5.6 \times 10^{-4}$
比活性	1	82	65	50000

\*) 50%抑制量(mg/mouse)

[0042] As a result, each TG concentration rise control peptide in three sorts of blood controlled the rise of TG concentration in blood. The peptide which has an amino acid sequence shown especially with the array number 1 showed 50000 times as much specific activity as peptide of a proteolysis thing. two sorts of other peptide on the other hand -- about [ of said peptide ] -- although it was 1/100 of specific activity, it had the specific activity of 50 times or more of a proteolysis thing.

[Example 2 of an examination] Peptide which has the amino acid sequence shown in the ICR system mouse of safety test sexes, such as this invention peptide, at the array number 1 which is this invention peptide, Changing the administration rate of Val-Tyr-Pro and Val-Thr-Leu, although more than 10g [kg] weight (peak which can be prescribed for the patient) administered orally, respectively, there was no example of death (0:1, 1:1, 1:0).

[0043]

[Effect of the Invention] The triglyceride concentration rise depressant in blood which contains triglyceride concentration rise control peptide in blood, the peptide concerned, etc. as an active principle by this invention, The feed which gave the food for specified health use (what is called functional food) which gave the triglyceride concentration rise restraining function in blood, and the triglyceride concentration rise restraining function in blood is provided.

[0044] By this invention, prevention and the therapies of a circulatory system disease, such as a person or obesity and the hyperlipidemia of an animal and hypertension accompanying

them, and arteriosclerosis, are attained. The fleshy improvement in livestock or a farmed fish is attained.

[0045]

[Layout Table]

array number: -- length [ of 1 arrangement ]; -- mold [ of 7 arrangement ]; -- amino acid  
topology: -- kind [ of straight-chain-shape arrangement ]; -- peptide sequence: -- Leu Val  
Val Tyr Pro Trp Thr